ศิริวรรณ ณะวงษ์ : การแยก คัดเลือก และระบุชนิดแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรติเนสจากกระบวนการหมักน้ำปลาเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ (ISOLATION, SELECTION AND IDENTIFICATION OF PROTEINASE-PRODUCING BACTERIA FROM FISH SAUCE FERMENTATION TO BE USED AS STARTER CULTURE) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล, 162 หน้า.

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อคัดแยกและระบุชนิดของแบคทีเรียที่สร้างโปรติเนส จากตัวอย่างน้ำปลาที่หมักในระยะเวลาต่างๆ และศึกษาผลของอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการเจริญ และผลิตโปรติเนสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้คัดแยกแบคทีเรียที่สร้างโปรติเนสจากตัวอย่างน้ำปลาที่หมักในช่วง 1-12 เดือน น้ำคาวปลา และเกลือสมุทร จำนวนทั้งสิ้น 50 ตัวอย่าง จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งสิ้น 308 ไอโซเลท พบว่า 27 ไอโซเลท สามารถย่อยโปรตีนจากปลากะตักได้ดี เมื่อระบุชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างเซลล์เป็นท่อนที่สร้างสปอร์ (spores) แบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเซลล์เป็นท่อน และแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างเซลล์กลม จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวข้างต้นจัดอยู่ในสกุล *Virgibacillus*, *Halomonas*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* และ *Staphylococcus* แบคทีเรียที่สร้างโปรติเนสซึ่งย่อยโปรตีนปลาได้ดีที่สุด 3 ไอโซเลท คือ SK33, SK37 และ SK1-1-5 โดย SK33 และ SK37 มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับ *Vigibacillus halodenitrificans* DSM 10037 96% และ 95% ตามลำดับ ส่วน SK1-1-5 มีความเหมือนกับ *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305 95% ดังนั้น SK33 และ SK37 จัดอยู่ในสกุล *Virgibacillus* และ SK1-1-5 จัดอยู่ในสกุล *Staphylococcus* จากการวิเคราะห์ผลด้วย Phylogenetic tree เมื่อประเมินผลร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา และความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene พบว่า *Virgibacillus* sp. SK33, *Virgibacillus* sp. SK37 และ *Staphylococcus* sp. SK1-1-5 มีแนวโน้มที่จะเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่

สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างโปรติเนสของแบคทีเรียที่คัดเลือกแต่ละไอโซเลทแตกต่างกัน *Virgibacillus* sp. SK33, *Virgibacillus* sp. SK37 และ *Staphylococcus* sp. SK1-1-5 เจริญได้ดีที่ระดับเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 18, 20 และ 15% ตามลำดับ ในอาหาร fish broth ที่มีความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ทุกไอโซเลทเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส *Virgibacillus* sp. SK33 สร้างโปรติเนสได้ดีที่สุดเมื่อเจริญในอาหาร fish broth ที่มีระดับเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% ที่ 40 องศาเซลเซียส ทั้ง *Virgibacillus* sp. SK37 และ *Staphylococcus*

sp. SK1-1-5 สร้างโปรติเนสได้ดีในอาหารที่มีระดับเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5% ที่ 35 องศาเซลเซียส สารสกัดจากยีสต์ และกลูโคสไม่จำเป็นต่อการเจริญและผลิตโปรติเนสของแบคทีเรียทั้งสามไอโซเลท และเมื่อทดลองเตรียมกล้าเชื้อเพื่อเร่งกระบวนการหมักน้ำปลาจากปลากะตัก พบว่าเมื่อเติมกล้าเชื้อลงในวัตถุดิบคือปลากะตักที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสในระดับ 0.25% (65 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง) และเอนไซม์เฟโวไซม์ในระดับ 0.5% (50 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง) และมีเกลือสมุทรที่ระดับความเข้มข้น 25% หลังจากหมักเป็นเวลา 120 วัน ปริมาณกรดอะมิโนแอลฟาของปลากะตักหมักที่เติม *Virgibacillus* sp. SK33, *Virgibacillus* sp. SK37 และ *Staphylococcus* sp. SK1-1-5 มีค่าสูงกว่าตัวอย่างควบคุม (วัตถุดิบที่ไม่เติมกล้าเชื้อ) ผลที่ได้จากการศึกษานี้แสดงถึงแนวโน้มในการใช้ประโยชน์แบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ในกระบวนการหมักน้ำปลา

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

SIRIWAN NAWONG : ISOLATION, SELECTION AND IDENTIFICATION OF PROTEINASE-PRODUCING BACTERIA FROM FISH SAUCE FERMENTATION TO BE USED AS STARTER CULTURES. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. JIRAWAT YONGSAWATDIGUL, Ph.D. 162 PP.

PROTEINASE-PRODUCING BACTERIA/FISH SAUCE FERMENTATION/ /PROTEINASE PRODUCTION/STARTER CULTURE

The objectives of this study were to isolate and identify proteinase-producing bacteria from various periods of fish sauce fermentation. In addition, the effects of temperature, pH, and NaCl concentration on bacterial growth and proteinase production of selected strains were investigated. Proteinase-producing bacteria were isolated from 50 samples of fish sauce fermented for 1-12 months, fish juice, and solar salt samples. A total of 308 bacterial isolates were collected, and 27 of them could hydrolyze anchovy proteins. Bacterial identification was performed using morphological and physiological characteristics. These bacterial isolates were Gram-positive and spore-forming rod, Gram-negative rod, and Gram-positive cocci. Based on 16S rRNA gene sequences, they were identified as *Virgibacillus*, *Halomonas*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, and *Staphylococcus*. Three selected isolates producing the highest proteinases were SK33, SK37 and SK1-1-5. SK33 and SK37 showed sequences homology to *Vigibacillus halodenitrificans* DSM 10037 96% and 95% similarity, respectively. SK1-1-5 showed 95% similarity to *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305. Thus, SK33 and SK37 were closely related to the genus *Virgibacillus*. SK1-1-5 was identified as the genus *Staphylococcus*. On the basis of the

phylogenetic analyses and the combination of morphological, physiological characteristics and 16S rRNA gene sequences, three isolates namely *Virgibacillus* sp. SK33, *Virgibacillus* sp. SK37 and *Staphylococcus* sp. SK1-1-5 were likely to be new species.

Optimum conditions for growth and proteinase production of each selected isolate were different. The optimum NaCl concentration for growth of *Virgibacillus* sp. SK33, *Virgibacillus* sp. SK37 and *Staphylococcus* sp. SK1-1-5 were 18, 20 and 15%, respectively, in fish broth at the initial pH 7. All isolates grew very well at 35^{o}C. *Virgibacillus* sp. SK33 optimally produced proteinase in the fish broth containing 25% NaCl at 40^{o}C. Both *Virgibacillus* sp. SK37 and *Staphylococcus* sp. SK1-1-5 showed their optimum temperature for proteinase production in fish broth containing 5% NaCl at 35^{o}C. Yeast extract and glucose were not needed for bacterial growth and proteinase production of three selected strains. The three selected isolates were also tested for their ability to accelerate protein hydrolysis of anchovy. Three starter cultures were added into anchovy hydrolysate prepared from 0.25% Alcalase® (65^{o}C for 2 h) and 0.5% Flavourzyme® (50^{o}C for 4 h) containing 25% solar salt. After incubation for 120 days, ∝-amino content of samples inoculated by *Virgibacillus* sp. SK33, *Virgibacillus* sp. SK37, and *Staphylococcus* sp. SK1-1-5 were higher than the control (without starter culture). These studies demonstrated the potential of three selected strains to be used as starter culture for fish sauce fermentation.

School of Food Technology
Academic Year 2006

Student's Signature_____
Advisor's Signature_____
Co-Advisor's Signature_____